

基于 16S rRNA 测序和 RT-qPCR 的硫化矿物表面微生物群落组成分析

Analysis of Microbial Community Composition on Sulfide Mineral Surface Based on 16S rRNA Sequencing and RT-qPCR

黄珊珊¹, 马丽媛^{2,3,*}, 刘学端^{1,3}

¹资源加工与生物工程学院, 中南大学, 长沙, 湖南; ²环境学院, 中国地质大学(武汉), 武汉, 湖北; ³生物冶金教育部重点实验室, 中南大学, 长沙, 湖南

*通讯作者邮箱: maly@cug.edu.cn

引用格式: 黄珊珊, 马丽媛, 刘学端. (2021). 基于 16S rRNA 测序和 RT-qPCR 的硫化矿物表面微生物群落组成分析. *Bio-101* e2003690. Doi: 10.21769/BioProtoc. 2003690.

How to cite: Huang, S. S., Ma, L. Y. and Liu, X. D. (2021). Analysis of Microbial Community Composition on Sulfide Mineral Surface Based on 16S rRNA Sequencing and RT-qPCR *Bio-101* e2003690. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003690. (in Chinese)

摘要:金属硫化物矿山具有 pH 值低、重金属含量高等特点, 为通过氧化亚铁和无机硫获取能量的冶金微生物提供了独特的寡营养生态位, 其中嗜酸硫杆菌属(*Acidithiobacillus*) 内不同种具有不同的铁硫氧化功能, 是酸性矿山环境及冶金过程的代表性优势属。16S rRNA 扩增子测序是研究微生物群落组成及多样性的重要手段, 但无法根据测序结果对 *Acidithiobacillus* 在种水平上加以区分。实时荧光定量 PCR(Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)因特异性好, 灵敏度高, 已成为现今物种定量分析的主流技术之一。为准确刻画浸矿过程中硫化矿物表面具有不同铁硫氧化功能的冶金微生物群落组成规律, 本文将 16S rRNA 测序与 RT-qPCR 技术相结合, 提出了一种高效精确的冶金微生物群落结构分析方法, 能够在种水平区分高丰度的铁硫氧化功能类群, 对研究微生物群落氧化硫化矿物的过程机理以及指导工业菌群的优化调控具有重要意义。

关键词: 酸性矿山, 矿物表面, 微生物, 16S rRNA 测序, RT-qPCR

材料与试剂

1. 50 ml 离心管(Corning, catalog number: 352070)
2. 10 ml 离心管(CNWTC, catalog number: TYA04)
3. 5 ml 离心管(Eppendorf, catalog number: 0030119401)
4. 1.5 ml 尖底离心管(Fisher Scientific, catalog number: 05-408-129)
5. 各种型号枪头(20 μ l, 200 μ l, 1 ml)
6. 0.2 mm 玻璃珠
7. 2 \times SYBR Green qPCR Master Mix 核酸染料
8. 96 孔 PCR 板(Axygen, PCR-96-FLT-C)
9. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
10. K_2HPO_4
11. KCl
12. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
13. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
14. 乙醇(96%-100%)
15. 琼脂糖
16. TBE 缓冲液(0.5x)
17. 双链 DNA 高灵敏度荧光定量试剂盒(Invitrogen, catalog number: Q32851)
18. TIANamp[®] Bacteria DNA 提取试剂盒(Tiagen Biotech, catalog number: DP302), 含有以下组分:
 - 1) 吸附柱 CB3
 - 2) 收集管(2 ml)
 - 3) 缓冲液 GA
 - 4) 缓冲液 GB
 - 5) 缓冲液 GD
 - 6) 缓冲液 PW
 - 7) 缓冲液 TE
 - 8) 蛋白酶 K
19. 溶菌酶缓冲液(20 mM Tris, pH 8.0; 2 mM Na_2EDTA ; 1.2% Triton; 终浓度为 20

mg/ml 的溶菌酶)

20. 9K 培养基(见溶液配方)
21. 琼脂糖凝胶(见溶液配方)

仪器设备

1. 烧杯
2. 移液枪
3. 分析天平
4. 高速离心机
5. 光学显微镜
6. 涡旋混合器
7. 电泳仪
8. NanoDrop-1000 微量分光光度计
9. Qubit 2.0 核酸蛋白定量仪
10. Illumina Miseq 测序平台
11. Veriti 96-well Fast Thermal Cycler 梯度 PCR 仪 (Thermo Fisher, model: 4375786)
12. Bio-rad iCycler iQ 实时定量 PCR 监测系统

实验步骤

1. 矿物表面微生物收集
 - 1.1 充分振荡混匀含有微生物的固液混合样品，吸取 5 ml 置于 10 ml 离心管中， $2,000 \times g$ 离心 2 min。
 - 1.2 离心后弃上清，或转至另一新的 10 ml 离心管中，以收集浸出液中的游离微生物。
 - 1.3 利用 25 ml 新鲜 9K 培养基，将离心管底部矿物样品重悬至 50 ml 离心管中。
 - 1.4 向管中加入 1 g 直径 0.2 mm 玻璃珠，然后在涡旋混合器上振荡 5 min。
 - 1.5 将上清液转移至收集管中，并在光学显微镜下检查是否有微生物细胞。
 - 1.6 重复上述矿物样品重悬步骤，直至上清液中未观察到细胞存在，则吸附在矿物表面微生物已被完全洗脱下来。

- 1.7 分别将含有游离微生物和吸附微生物的上清液在 $12,000 \times g$ 转速下离心 10 min, 弃上清。
- 1.8 加入 1 ml 新鲜 9K 培养基, 重新悬浮菌体, 将其转入新的 1.5 ml 尖底离心管中, $12,000 \times g$ 离心 2 min, 弃上清。
- 1.9 重复步骤 1.8 3-5 次, 以去除浸出液中残留的重金属离子和微细粒矿渣, 避免对 DNA 提取造成影响。
- 1.10 立即采用试剂盒对微生物菌体细胞进行 DNA 提取。

注: 应尽量去除体系中的重金属离子和微细粒矿渣, 防止提取的 DNA 片段较小或质量下降。

2. DNA 提取

使用 TIANamp[®] Bacteria DNA 提取试剂盒进行 DNA 的提取, 具体步骤如下:

- 2.1 向步骤 1.9 所得的菌体中加入 100 μ l 缓冲液 GA, 振荡至菌体彻底悬浮; 加入 100 μ l 溶菌酶缓冲液, 37°C 温育 30 min; 加入 20 μ l 蛋白酶 K, 吸打混匀; 加入 220 μ l 缓冲液 GB, 振荡约 15 s 后, 70°C 放置 10 min 以上。

注: 若缓冲液 GA 或 GB 中有沉淀, 可在 37°C 水浴至溶解, 摇匀后使用。

- 2.2 加入 220 μ l 乙醇(96-100%), 充分震荡约 15 s 后, 加入吸附柱 CB3 中(吸附柱放入 2 ml 收集管中), $13,400 \times g$ 离心 30 s, 丢弃废液。

- 2.3 向吸附柱 CB3 中加入 500 μ l 缓冲液 GD(使用前确保已加入 96-100%乙醇), $13,400 \times g$ 离心 30 s, 丢弃废液。加入 600 μ l 缓冲液 PW(使用前确保已加入 96-100%乙醇), $13,400 \times g$ 离心 30 s, 丢弃废液。重复加入缓冲液 PW 并离心弃废液。

- 2.4 采用 $13,400 \times g$ 离心 2 min, 将吸附柱 CB3 放置于一个干净的 1.5 ml 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 80 μ l 洗脱缓冲液 TE。室温放置 2-5 min, $13,400 \times g$ 离心 2 min, 此时上清液中即含有基因组 DNA。

注: DNA 提取完成后置于 -20°C 保存, 应尽量避免反复冻融, 以防止降解。

3. 群落组成分析

3.1 高通量测序

- 1) 使用引物 515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增 DNA 样本的 16S rRNA 基因 V4 区,

PCR 反应条件为：94 °C 预变性 5 min 后，进行 28 个循环(94 °C 变性 45 s, 62 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min)，最后在 72 °C 下延伸 10 min。PCR 产物经纯化后用于文库构建，经质量检测合格后采用 PE300 测序策略于 Illumina Miseq 测序平台进行高通量测序(详见 Ma *et al.*, 2018)。

3.2 RT-qPCR

1) 标准曲线的构建

- a. 采用特异性引物(表 1)对 *Acidithiobacillus* 属内四个优势种的基因组进行普通 PCR 扩增，普通 PCR 反应程序为：94 °C 预变性 3 min；[94 °C 解链 30 s，特异退火温度(55 °C-59 °C)30 s，72 °C 延伸 1 min](30 个循环)；72 °C 延伸 5 min。测定 PCR 产物浓度并换算成拷贝数，作为标准品经 10 倍梯度稀释后，取 10⁹-10² copies/μl 稀释样品，以构建不同菌株的标准曲线。

- b. 拷贝数换算公式：拷贝数(copies/μl)= $\frac{6.02 \times 10^{23} \times c}{MW}$

注：其中 c(ng/μL)为浓度；MW=碱基数目(bp)× 660(Daltons/bp)

表 1. RT-qPCR 扩增 *Acidithiobacillus* 菌属的特异性引物信息*

Target species	Primer name	Primer sequences (5'-3')	Amplicon length (bp)
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	rus-S	ACAAGGGATTCGGTCATAGTTT	153
	rus-A	CCGTCGGATGCCAGGTAAA	
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	soxX1-S	CAGTATTCCACCCATCAACG	114
	soxX1-A	ACTCCACCTGGCAAGACAT	
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Sqr-S	GCTCGGCAGCCTCAATAC	136
	Sqr-A	GGTCGGACGGTGGTACTG	
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	CspA-S	TCCTCAGCCTGCATGCCT	180
	CspA-A	TGGTACAGTAAAGTGGTTCA	

* Ma *et al.*, 2017a; Ma *et al.*, 2017b; Ma *et al.*, 2018; Tao *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2020

2) RT-qPCR 反应

- a. 基于 Bio-rad iCycler iQ 实时定量 PCR 监测系统, 采用四个优势种的特异性引物进行 RT-qPCR 扩增。反应体系(25 μ l)包括: 2 \times SYBR Green 核酸染料, 12.5 μ l; 上下游引物, 各 0.5 μ l; 双蒸水, 6.5 μ l; cDNA 模板, 5 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 40 个循环内(95 $^{\circ}$ C, 30 s; 55-59 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 30 s); 95 $^{\circ}$ C, 1 min; 55 $^{\circ}$ C, 10 s(其中 55-59 $^{\circ}$ C 为不同引物的特异退火温度); 80 个循环内(自 59 $^{\circ}$ C 每个循环增加 0.5 $^{\circ}$ C, 至 99 $^{\circ}$ C, 每个循环 10 s); 4 $^{\circ}$ C 延伸, 反应终止。每个样品设置三个技术重复, 同时每板设置三个阴性对照。

结果与分析

1. 通过 1.0%(w/v)琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop-1000 微量分光光度计检测矿物表面微生物 DNA 提取质量, 并利用双链 DNA 高灵敏度荧光定量试剂盒在 Qubit 2.0 核酸蛋白定量仪上测定 DNA 浓度。
2. 16S rRNA 基因测序技术为微生物群落的组成及多样性研究提供了强有力的工具, 能够识别已知和未知物种, 但通常只能鉴定至属水平(Lukhele *et al.*, 2019)。据报道, 酸性矿山环境物种多样性相对较低, 代表性优势类群约占微生物总量的 90%, 如既能氧化亚铁又能氧化硫的嗜酸硫杆菌属 (*Acidithiobacillus*) 和硫化杆菌属 (*Sulfobacillus*), 仅能氧化亚铁的钩端螺旋菌属 (*Leptospirillum*) 和铁质菌属 (*Ferroplasma*)。其中, *Acidithiobacillus* 是广泛存在于 AMD 环境的典型类群, 该属中嗜酸氧化亚铁硫杆菌(*A. ferrooxidans*)和耐冷嗜酸硫杆菌(*A. ferrivorans*)能够氧化亚铁和硫获取能量, 而嗜酸氧化硫硫杆菌(*A. thiooxidans*)和嗜酸性喜温硫杆菌(*A. caldus*)仅能够通过氧化矿物中的硫获得能量维持自身代谢(Chen *et al.*, 2015; Méndez-García *et al.*, 2015)。RT-qPCR 虽无法挖掘未知物种信息, 但能够对已知物种进行精确定量。

表 2. 铁硫富集群落在黄铜矿浸出过程中优势属相对丰度

Genus	Fe-O			S-O		
	Day 12	Day 18	Day 24	Day 12	Day 18	Day 24
<i>Acidithiobacillus</i>	99.48%	96.01%	64.91%	81.76%	82.73%	76.36%
<i>Leptospirillum</i>	0.02%	0.23%	23.85%	0.004%	0.36%	16.48%
<i>Sulfobacillus</i>	0.06%	3.39%	8.43%	18.04%	16.77%	11.31%
<i>Sphingomonas</i>	0.05%	0.04%	0.00%	0.02%	0.003%	0.00%
<i>Streptophyta</i>	0.03%	0.005%	0.01%	0.02%	0.01%	0.01%

3. 在分别利用富铁少硫能源底物和富硫少铁能源底物驯化菌群(分别命名为 Fe-O 和 S-O)进行黄铜矿浸出实验中，16S rRNA 高通量测序结果表明，在各组中 *Acidithiobacillus* 均为绝对优势属(>60%)，在 Fe-O 群落浸出初期占比甚至高达 99%(表 2)，但铁氧化菌或硫氧化菌在群落中的占比并不清楚。基于 RT-qPCR 精确定量结果，获得 *A. ferrooxidans*、*A. ferrivorans*、*A. thiooxidans* 和 *A. caldus* 的扩增比例，带入 16S rRNA 测序结果中 *Acidithiobacillus* 的相对丰度，计算属内四个优势种在整个样本中的相对量，并将微生物群落组成以柱形图展示。如图 1 所示，*Acidithiobacillus* 属内不同铁硫氧化功能类群的相对丰度得以明确，在铁富集浸出体系中，*A. ferrooxidans* 和 *A. caldus* 为优势种，分别占 30%-45%和 30%-65%；而 *A. thiooxidans* 和 *A. ferrooxidans* 在硫富集浸出体系中占据主导地位，相对丰度分别约为 50%和 20%。因此，在 16S rRNA 测序的基础上，联合 RT-qPCR 技术精确定量 *Acidithiobacillus* 属的不同功能类群，能够更加全面揭示浸出过程中群落组成及演替规律，为冶金微生物的浸出行为及机理研究奠定基础。(Ma et al., 2018; Tao et al., 2018)。

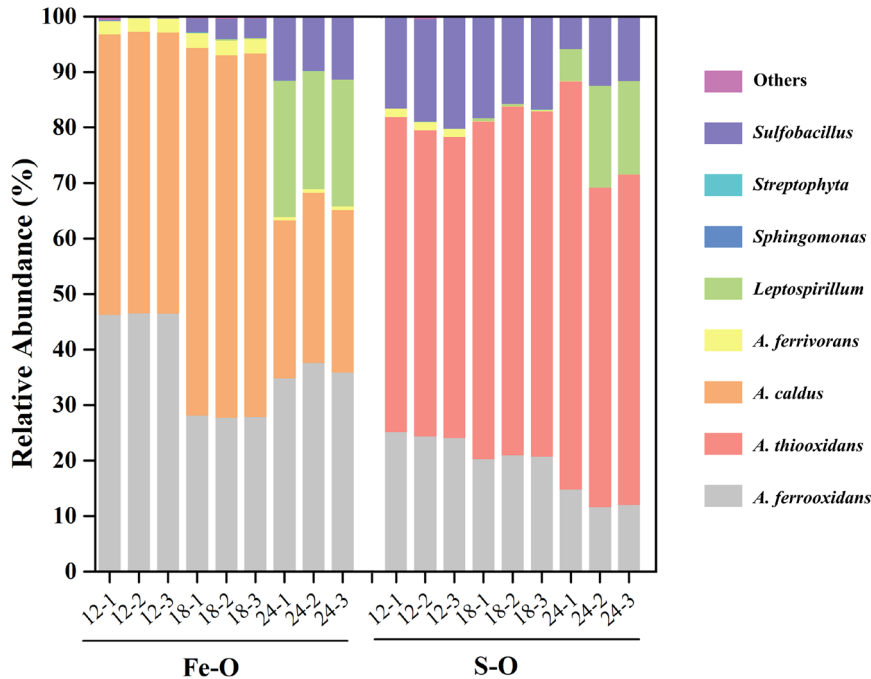


图 1. 铁硫富集群落在黄铜矿浸出过程中群落演替规律

溶液配方

1. 9K 培养基

(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
KCl	0.1 g
Ca(NO ₃) ₂	0.01 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
溶于 1 L 蒸馏水中	

2. 琼脂糖凝胶(1%)

琼脂糖	1 g
TBE 缓冲液(0.5x)	100 ml

致谢

本工作的顺利开展得益于国家自然科学基金项目(资助号: 42007306 和 31570113)和中南大学生物冶金教育部重点实验室基金(资助号: MOEKL1702)的支持。

参考文献

1. Chen, L. X., Hu, M., Huang, L. N., Hua, Z. S., Kuang, J. L., Li, S. J. and Shu, W. S. (2015). [Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage](#). *ISME J* 9(7): 1579-1592.
2. Lukhele, T., Selvarajan, R., Nyoni, H., Mamba, B. B. and Msagati, T. A. M. (2019). [Diversity and functional profile of bacterial communities at Lancaster acid mine drainage dam, South Africa as revealed by 16S rRNA gene high-throughput sequencing analysis](#). *Extremophiles* 23(6): 719-734.
3. Ma, L., Wang, X., Feng, X., Liang, Y., Xiao, Y., Hao, X., Yin, H., Liu, H. and Liu, X. (2017a). [Co-culture microorganisms with different initial proportions reveal the mechanism of chalcopyrite bioleaching coupling with microbial community succession](#). *Bioresour Technol* 223: 121-130.
4. Ma, L., Wang, X., Tao, J., Feng, X., Zou, K., Xiao, Y., Liang, Y., Yin, H. and Liu, X. (2017b). [Bioleaching of the mixed oxide-sulfide copper ore by artificial indigenous and exogenous microbial community](#). *Hydrometallurgy* 169: 41-46.
5. Ma, L., Wang, X., Liu, X., Wang, S. and Wang, H. (2018). [Intensified bioleaching of chalcopyrite by communities with enriched ferrous or sulfur oxidizers](#). *Bioresour Technol* 268: 415-423.
6. Méndez-García, C., Peláez, A. I., Mesa, V., Sánchez, J., Golyshina, O. V. and Ferrer, M. (2015). [Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats](#). *Front Microbiol* 6: 475.
7. Tao, J., Qin, C., Feng, X., Ma, L., Liu, X., Yin, H., Liang, Y., Liu, H., Huang, C., Zhang, Z., Xiao, N. and Meng, D. (2018). [Traits of exogenous species and indigenous community contribute to the species colonization and community succession](#). *Front Microbiol* 9: 3087.
8. Wang, X., Ma, L., Wu, J., Xiao, Y., Tao, J. and Liu, X. (2020). [Effective bioleaching of low-grade copper ores: Insights from microbial cross experiments](#). *Bioresour Technol* 308: 123273.